

ACTIVIDAD "IN VITRO" DE PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN VEGETAL SOBRE LARVAS DE *Meloidogyne incognita* (Nematoda: Meloidogynidae)

GRACIELA MAREGGIANI¹; ALICIA PELICANO¹; ADELA FRASCHINA²; G. BILOTTI²; NORMA GOROSITO¹ y G. ZIPETO¹

Recibido: 12/04/96

Aceptado: 22/08/96

RESUMEN

Se analizó el efecto "in vitro" de algunos productos naturales de origen vegetal sobre la mortalidad de larvas de *Meloidogyne incognita*. Se utilizaron extractos acetónicos de hojas de *Acacia longifolia* (Leguminosae), *Mentha* sp. (Lamiaceae), *Ruta chalepensis* (Rutaceae), *Schinus molle* (Anacardiaceae) y *Urtica urens* (Urticaceae), flores de *Tagetes patula* (Asteraceae), frutos verdes y maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae), y frutos maduros de *Coriandrum sativum* (Apiaceae), comparándolos con un nematocida sintético y un testigo.

Mientras que *Mentha* sp. y *S. molle* no tuvieron actividad biocida, los siete extractos restantes presentaron diferencias significativas con el testigo ($p < 0,05$), siendo los más efectivos *M. azedarach* fruto verde, *A. longifolia* y *T. patula* ya que tuvieron diferencias significativas con el nematocida a las 48 horas ($p \leq 0,05$).

Palabras clave: *Meloidogyne incognita* - Nematicidas - Productos vegetales naturales.

"IN VITRO" ACTIVITY OF NATURAL PLANT PRODUCTS UPON *Meloidogyne incognita* LARVAE (Nematoda, Meloidogynidae)

SUMMARY

The "in vitro" effect of some natural plant products on mortality of *Meloidogyne incognita* larvae was tested. Acetonic extracts of *Acacia longifolia* (Leguminosae), *Mentha* sp. (Lamiaceae), *Ruta chalepensis* (Rutaceae), *Schinus molle* (Anacardiaceae) and *Urtica urens* (Urticaceae) leaves, *Tagetes patula* (Asteraceae) flowers, *Melia azedarach* (Meliaceae) green and ripe fruits, and ripe fruits of *Coriandrum sativum* (Apiaceae) were used, comparing their effect with a synthetic nematocide and a control.

While *Mentha* sp. and *S. molle* did not act as biocides, there were significant differences between the control and the seven remaining extracts ($p < 0,05$). The most effective among them were *M. azedarach* (green fruits), *A. longifolia* y *T. patula* with significant differences with the nematocide after 48 hours ($p \leq 0,05$).

Key words: *M. incognita* - Nematicides - Natural plant products.

INTRODUCCION

La protección de los cultivos contra el perjuicio que pueden producir los nematodos es imprescindible para la obtención de buenos rendimientos. Aunque en nuestro país no existen estadísticas al respecto, es interesante tomar en cuenta que a nivel mundial las

pérdidas debidas a nematodos llegan a valores de 80.000.000 de dólares anuales (Sasser, 1989).

En Argentina los daños se manifiestan en particular en cultivos intensivos (Moreno, 1975), de tal modo que en ciertas localidades del noroeste, se debió suspender el cultivo de tomate debido a la

¹Cátedra de Zoología Agrícola, F.A.U.B.A., Avda. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires

²Cátedra de Bioquímica, F.A.U.B.A., Avda. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires

presencia persistente de *Meloidogyne* sp. (Navas Sanchez, 1988).

El género *Meloidogyne* Goeldi, 1987 (Nemata: Tylenchida) está representado en Argentina por ocho especies: *M. acrita*, *M. arenaria*, *M. cruciani*, *M. decalineata*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. ottersoni*, así como por poblaciones de especies no identificadas (*Meloidogyne* sp.), siendo *M. incognita* y *M. arenaria* las más frecuentes (Doucet, 1993).

En protección vegetal, los métodos de control más comunes contra *Meloidogyne* spp. son los químicos, en particular en cultivos bajo cubierta, sin tener en cuenta que son un componente más en el agravamiento de la contaminación ambiental. En la búsqueda de métodos alternativos, diversos autores han iniciado investigaciones tendientes a determinar el potencial nematocida de extractos vegetales como fuente de semioquímicos que actúen como nematocidas o nemastáticos (Chandel y Mehta, 1990; Benner, 1993). En el caso de algunas especies vegetales como *Azadirachta indica* y *Tagetes* sp. no sólo se demostró su eficacia sino que también se analizaron los compuestos activos (Bakker *et al.*, 1979; Mark Lee *et al.*, 1991).

El objetivo de este trabajo fue, por tal motivo, analizar la acción nematocida o nemastática de algunos productos naturales de origen vegetal.

MATERIALES Y METODOS

a) Material vegetal

Se utilizaron hojas de *Acacia longifolia* (Leguminosae), *Mentha* sp. (Lamiaceae), *Ruta chalepensis* (Rutaceae), *Schinus molle* (Anacardiaceae) y *Urtica urens* (Urticaceae), flores de *Tagetes patula* (Asteraceae), frutos verdes y maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) y frutos maduros de *Coriandrum sativum* (Apiaceae).

b) Obtención de los extractos

Se efectuó la extracción semicontinua del material vegetal en extractor tipo Soxhlet con acetona sobre 2 g de muestra. El extracto se llevó a sequedad en evaporador rotativo marca Büchi. Al residuo obtenido se le agregó 50 ml de etanol 96° y 10 ml de solución concentrada de KOH (60 g de KOH en 40 ml de agua) y se calentó durante una hora en baño de agua a 100°C, con condensador a reflujo. El producto resultante se separó con éter sulfúrico descartándose la porción saponificable. El extracto etéreo (porción insaponificable) se llevó a sequedad a presión reducida y el residuo se disolvió en

5 ml de acetona, llevándolo nuevamente a sequedad (AOAC, 1990).

c) Determinación de actividad biológica

Se trabajó con un diseño de bloques al azar con once tratamientos y tres repeticiones, en cada uno de tres ensayos realizados entre los años 1993 y 1995. Nueve de los tratamientos consistieron en la aplicación de extractos de los vegetales ya mencionados en el punto a), el décimo en la utilización de un nematocida de uso comercial (carbofuran: 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato) y el onceavo (testigo), en la incorporación de 1 ml de agua con dos gotas de Tween 20 a la suspensión de nematodos.

El extracto seco se disolvió con agua destilada y 2 gotas de Tween 20, a una concentración de 100 mg/ml.

En recipientes de 2 cm de diámetro y 0,8 cm de altura se pipeteó 1 ml de una suspensión acuosa de 10 larvas infectivas de *Meloidogyne incognita* y 1 ml de la solución del extracto.

Los nematodos fueron observados a la hora y 48 hs después del agregado de los extractos. En cada instancia se determinó el número de individuos muertos, considerando en este estado cuando se encuentran con el cuerpo rígido y no reaccionan ante estímulos provocados con agujas en distintas partes de su cuerpo (Lazzeri *et al.*, 1993). Realizada la observación se tamizó la suspensión por malla de 70 micrones. Todos los nematodos retenidos se recogieron en agua destilada y se observaron para determinar si el efecto de los extractos es nemastático o nematocida.

Se efectuó la transformación angular de los resultados y posteriormente el análisis de variancia y prueba de comparaciones múltiples LSD.

RESULTADOS Y DISCUSION

Analizando el cuadro N° I correspondiente a la mortalidad una hora después del tratamiento, así como la figura 1 se observa que en siete de los extractos en estudio (*A. longifolia*, *C. sativum*, *M. azedarach* fruto maduro, *M. azedarach* fruto verde, *R. chalepensis*, *T. patula* y *U. urens*) los valores de mortandad fueron significativamente superiores al testigo ($p \leq 0,05$). *Mentha* sp. no presentó acción nematocida, resultado que se aparta de lo esperado ya que otros autores habían observado disminuciones en la población de nematodes tylenchidos incorporando enmiendas de hojas de esta especie en suelo infectado (Haseeb *et al.*, 1984), mientras que enmiendas de hojas y tallos de esta planta aromática en el cultivo de papa disminuyeron la reproducción del nematode *Globodera pallida* en 87% con respecto al testigo

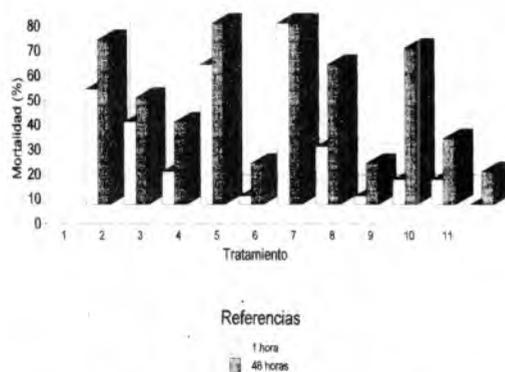
Cuadro N° 1: Mortalidad de *Metoidogyne incognita* una hora después de iniciados los tratamientos

Tratamiento	Mortalidad inducida %	Grupos homogéneos
<i>Acacia longifolia</i>	46,70	fg
<i>Coriandrum sativum</i>	33,30	ef
<i>M. azedarach</i> (fr. mad.)	13,30	cd
<i>M. azedarach</i> (fr. verde)	56,70	gh
<i>Mentha</i> sp.	3,30	ab
Nematicida	73,30	h
<i>Ruta chalepensis</i>	23,30	de
<i>Schinus molle</i>	3,30	ab
<i>Tagetes patula</i>	10,00	cd
<i>Urtica urens</i>	10,00	bc
Testigo	0,00	a

(Canto Saenz *et al.*, 1993). Igual comportamiento manifestó el extracto de *S. molle*, evidencia que ya había sido registrada en dicha investigación. De los extractos con actividad nematicida el más efectivo fue *M. azedarach* (fruto verde), no registrando diferencias significativas con el nematicida sintético.

Al analizar el cuadro N°2 correspondiente a la mortalidad 48 hs después del tratamiento, así como

también la figura 1, se observa que continúan sin ofrecer actividad nematicida los extractos de *Mentha* sp. y de *S. molle*, siendo los valores de mortalidad de los siete extractos restantes (*A. longifolia*, *C. sativum*, *M. azedarach* fruto maduro, *M. azedarach* fruto verde, *R. chalepensis*, *T. patula* y *U. urens*) significativamente superiores al testigo ($p \leq 0,05$). La modi-

**Figura 1: Mortalidad de *M. incognita*, 1 y 48 horas después del tratamiento.**

Tratamiento: 1. *Acacia longifolia*; 2. *Coriandrum sativum*; 3. *Melia azedarach* maduro; 4. *Melia azedarach* verde; 5. *Mentha* sp.; 6. Nematicida; 7. *Ruta chalepensis*; 8. *Schinus molle*; 9. *Tagetes patula*; 10. *Urtica urens*; 11. Testigo

Cuadro N° 2: Mortalidad de *Metoidogyne incognita* a las 48 horas de iniciados los tratamientos

Tratamiento	Mortalidad inducida %	Mortalidad correg. % ⁽¹⁾	Grupos homogéneos
<i>Acacia longifolia</i>	66,70	61,50	fg
<i>Coriandrum sativum</i>	43,30	34,60	de
<i>M. azedarach</i> (fr. mad.)	33,30	23,10	cd
<i>M. azedarach</i> (fr. verde)	73,30	69,20	g
<i>Mentha</i> sp.	16,70	3,80	ab
Nematicida	73,30	69,20	h
<i>Ruta chalepensis</i>	56,70	50,00	ef
<i>Schinus molle</i>	16,70	3,80	ab
<i>Tagetes patula</i>	63,30	57,70	fg
<i>Urtica urens</i>	26,70	15,40	bc
Testigo	13,30	0,00	a

⁽¹⁾ Mortalidad corregida con Fórmula de Abbott

Mc= (%Mort. inducida-%Mort. testigo)-(100-%Mort.testigo)

ficación con respecto a lo observado una hora después de los tratamientos es que la aplicación de *T. patula* y *A. longifolia* determinó valores de mortalidad significativamente iguales a los observados con el nematicida y con *M. azedarach* fruto verde ($p \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos con *T. patula* coinciden con los presentados por Miller (1978) quien obtuvo diferencias significativas en la toxicidad sobre *Pratylenchus penetrans* a las 24 y 48 hs de su aplicación. Experiencias realizadas con *T. tenuifolia* (Siddiqui y Alam, 1988), *T. erecta* (Castro *et al.*, 1990), y *T. minuta* (Bautista *et al.*, 1993) indican resultados semejantes a los descriptos. Según Birch *et al.* (1993) dicha actividad se atribuye a la presencia del compuesto α -terthienyl perteneciente a la clase de los thienyl derivados. En el caso de *M. azedarach* los principios activos son 1-Cinnamoylmelianolone y 1-Cinnamoyl-3,11-dihydroxy-meliacarpin ubicados dentro de los tetranortri terpenoides limonoides (Mark Lee *et al.*, 1991). Su efecto nematicida ya ha sido verificado a nivel de enmienda orgánica sobre *Rotylenchulus reniformis* (Lal *et al.*, 1977) y sobre *M. incognita* (Verma, 1986). Respecto a *A. longifolia* es interesante hacer notar que no se encontraron menciones previas referentes a la actividad nematicida aquí registrada.

El hecho de que la actividad nematicida se haya detectado en extractos procedentes de especies vegetales de distintas familias hace suponer que los metabolitos secundarios responsables de dicha acción no sean de igual naturaleza en todos los casos estudiados. Se suma a ello el conocimiento de que el rango de estas sustancias presentes en cada

especie vegetal puede variar ampliamente debido a que se desarrollan a través de la evolución como una protección contra el ataque de insectos y patógenos microbianos (Benner, 1993). Por lo tanto, sólo una posterior profundización de las investigaciones sobre la relación estructura-actividad permitirá determinar con certeza cuáles son los principios activos responsables de la acción mencionada en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. Ciertos productos naturales de origen vegetal presentan acción nematicida.
2. Tanto 1 hora como 48 horas después de iniciados los tratamientos, presentan diferencias significativas con el testigo *A. longifolia*, *C. sativum*, *M. azedarach* (fruto verde y maduro), *R. chalepensis*, *T. patula* y *U. urens* ($p \leq 0,05$).
3. Una hora después de iniciados los tratamientos, presenta igual actividad que el nematicida sintético *M. azedarach* fruto verde, mientras que en la observación de las 48 horas también lo hacen *A. longifolia* y *T. patula* ($p \leq 0,05$).

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Horacio Rizzo, Profesor Titular de la Cátedra de Zoología Agrícola FAUBA, por las correcciones y sugerencias efectuadas al manuscrito.

Al Ing. Agr. Juan J. Valla, Profesor Titular de la Cátedra de Botánica Agrícola FAUBA, por la provisión e identificación de la mayor parte de las especies vegetales ensayadas.

BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th.edition. Ed. A.O.A.C. Inc., Virginia, USA. 1298 p.
- BAKKER, J.; F. J. GONNERS; I. NIEWENHUIS and H. WYNBERG. 1979. Photoactivation of the nematicidal compound α -terthienyl from roots of marigolds (*Tagetes* species). *J. Biol. Chem.* 254 (6):1841-1844.
- BAUTISTA, W.; L. GAVILANO y P. JATALA. 1993. Determinación de fracciones activas de extractos clorofórmicos de hojas y raíces de *Tagetes minuta*. XXV Ann. Meet. ONTA. *Abs.*, p. 10.
- BENNER, J. P. 1993. Pesticidal compounds from higher plants. *Pestic. Sci.* 39:95-102.
- BIRCH, N. E.; W. M. ROBERTSON and L. E. FELLOWS. 1993. Plant products to control plant parasitic nematodes. *Pestic. Sci.* 39: 141-145.
- CANTO-SAENZ, M.; M. TORREL; A. MATOS; O. CHAVEZ and A. GONZALEZ. 1993. Use of organic amendments for the control of *Globodera pallida* (PCN) in Perú. XXV Ann. Meet. ONTA. *Abs.* p. 12.

- CASTRO, A.A.E.; E. ZAVALA-MEJIA; V.I. CID DEL PRADO y G.V. ZAMUDIO. 1990. Rotación e incorporación de *Tagetes erecta* L. para el manejo de *Meloidogyne incognita* en el cultivo de tomate en Tecamachalco, Puebla. *Revta. Mexicana de Fitopatología*. 8:173-180.
- CHANDEL, Y.S. and MEHTA, P.K.. 1990. Nematicidal properties of leaf extracts of wild sage (*Lantana camara*). *Indian Journ. Agric. Sc.* 60 (11) : 781 .
- DOUCET, M. 1993. Consideraciones acerca del género *Meloidogyne* Goeldi, 1887 (Nemata: Tylenchida) y su situación en Argentina. Asociaciones y distribución. *Agriscientia*, 10:63-8:63-80.
- HASEEB, A.; M.M. ALAM and A.M. KHAN. 1984. Control of plant parasitic nematodes with chopped plants leaves. *Indian Pl. Path.* 2:180-181.
- LAL, A.; B.S. YADAV and R.P. NANDWANA. 1977. Effect of chopped leaves of various plants and sewage on the plant growth and reniform nematode *Rotylenchulus reniformis*. *Indian J. Mycol. and Pl. Path.* 7 (1):68-69.
- LAZZERI, L.; R. TACCONI and S. PALMIERI. 1993. "In vitro" activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. *J. Agric. Food. Chem.* 41:825-829.
- MARK LEE, S.; J.A. KLOCKE; M. BARNBY; R.B. YAMASAKI and M.F. BALANDRIN. 1991. Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae). In Hendin, P.A. "Naturally pest bioregulators". Chapter 19:293-304.
- MILLER, P.M. 1978. Toxicity of homogenized leaves of woody and herbaceous plants to roots lesion nematodes in water and in soil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103 (1):78-81.
- MORENO, A. 1975. Nematodos. En: Fernandez Valiela, "Introducción a la Fitopatología". Col. Cient. INTA. Tomo VII. Vol. II. Cap. IV
- NAVAS SANCHEZ, A., 1988. Los nematodos del suelo y su influencia en la producción vegetal. *Revista ASAO* 39: 4-5: 50-53.
- SASSER, J. 1989. Plant parasitic nematodes: The farmer's hidden enemy. Univ. Graphics, North Carolina State Univ., Raleigh. 115 p.
- SIDDIQUI, M.A. and M.M. ALAM. 1988. Control of plant parasitic nematodes by *Tagetes tenuifolia*. *Revue Nématol.* 11 (3):369-370.
- VERMA, R.R. 1986. Efficacy of organic amendments against *Meloidogyne incognita* infesting tomato. *Indian J. Nematol.* 16 (1):105-106.